

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

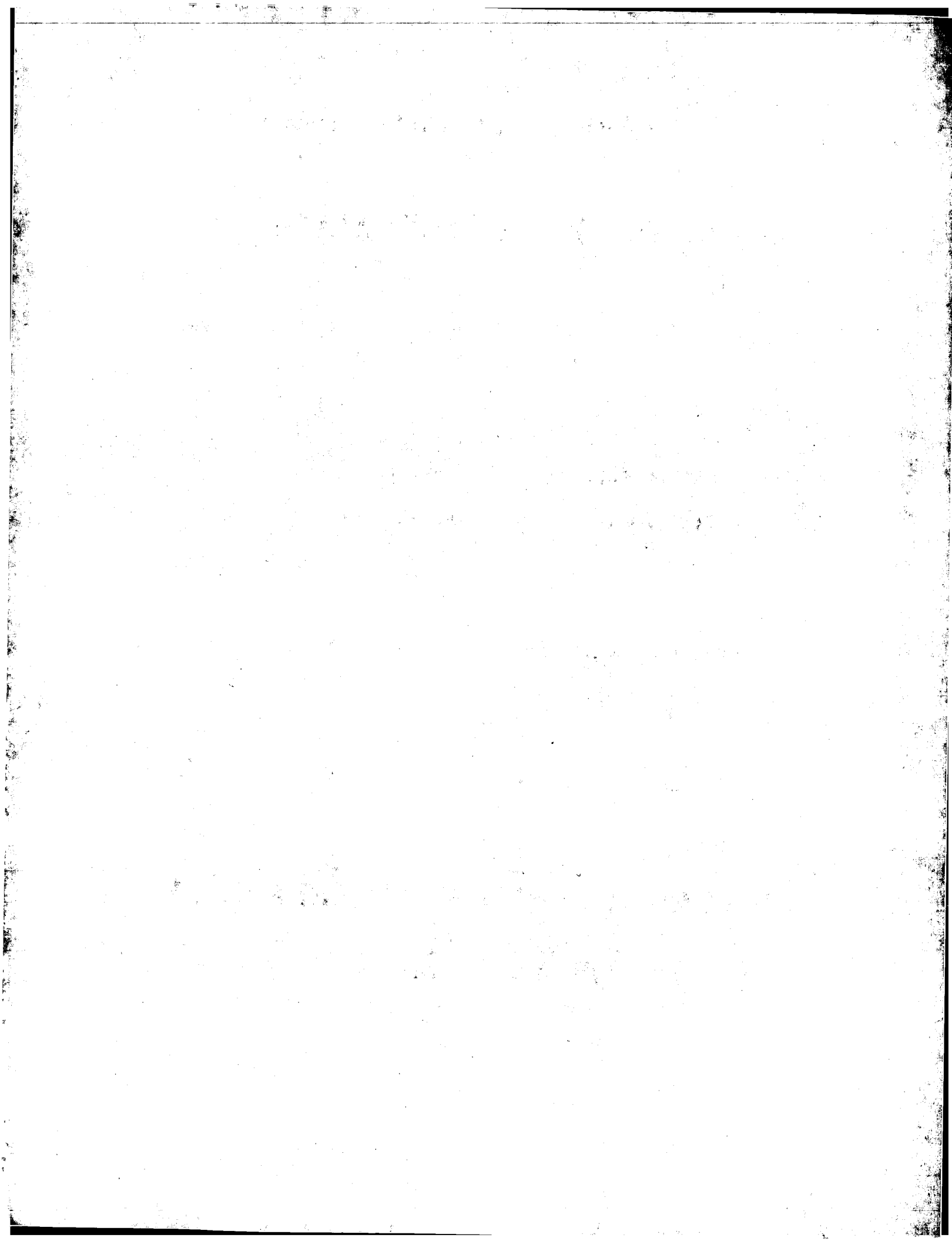
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

**BR1**

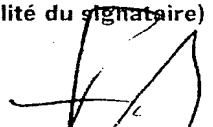
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DE 540 © W / 030103

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>14 MAI 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0305768</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>14 MAI 2003</b> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>Cabinet REGIMBEAU</b> <b>20, rue de Chazelles</b> <b>75847 PARIS CEDEX 17</b> <b>FRANCE</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) <b>240589 D20701 BF</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  <b>MICROORGANISME A ACTIVITE METHIONINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA METHIONINE.</b>			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation <b>FRANCE</b> Date <b>18-02-2003</b> N° <b>0301924</b> Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		<b>METABOLIC EXPLORER</b>	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<b>423703107</b>	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	<b>BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE, FR</b>	
	Code postal et ville	<b>63360 SAINT BEAUZIRE</b>	
	Pays	<b>FRANCE</b>	
Nationalité		<b>Française</b>	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

**BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES DATE <b>14 MAI 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0305768</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	OB 540 W / 030103
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		240589 - BF           Cabinet REGIMBEAU      20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17  01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b> 		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  M. ROCHET	

## Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

5 La présente invention se rapporte au domaine de la bioconversion et d'obtention d'acides aminés par fermentation de microorganismes. Elle se rapporte à une méthode de criblage et d'évolution dirigée permettant d'identifier une souche de microorganisme, éventuellement génétiquement modifié, possédant une enzyme à  
10 activité « méthionine synthase » modifiée, ladite souche produisant de l'acide 2-Amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en particulier de la L-méthionine (acide 2-Amino-4-(méthylmercapto)butyrique). L'invention concerne également la souche de microorganisme, les enzymes améliorées et à leurs séquences codantes. L'invention concerne enfin un procédé de préparation de la méthionine par culture de ladite souche de microorganisme.

15 La DL-Méthionine est produite industriellement par synthèse chimique. Le méthyl-mercaptan réagit avec l'acroléine pour produire le  $\beta$ -méthyl thiopropionaldéhyde, qui réagit avec l'hydrogène cyanide pour produire l' $\alpha$ -hydroxy- $\gamma$ -méthyl-thio-butyro-nitrile. Après traitement avec l'ammoniac, et une hydrolyse, on obtient la méthionine.

20 Tous les producteurs industriels de la DL-méthionine utilisent les mêmes matières premières à savoir l'acroléine, le méthane thiol (méthyl-mercaptan), l'hydrogène cyanide et l'ammoniac ou l'ammonium carbonate. Le procédé de synthèse du mélange racémique peut être conduit en batch ou en continu.

Un procédé industriel combine à la synthèse chimique de la biocatalyse par  
25 l'utilisant l'acétyl-coA synthase, enzyme produite par *Aspergillus oryzae* pour obtenir uniquement la L-méthionine à partir de la DL-méthionine.

Les brevets US 6,379,934 et EP 1 055 730 se rapportent à la production d'acides aminés en utilisant une souche de bactéries corynéformes, dans laquelle le gène *accBC* est amplifié. La méthionine est mentionnée, mais seule la préparation de  
30 L-lysine est exemplifiée.

Toutefois, la synthèse d'acides aminés soufrés culture de microorganisme reste difficile à mettre en œuvre à des niveaux susceptibles de conduire à une

exploitation industrielle, notamment du fait de la complexité de leurs voies de biosynthèse et de nombreux mécanismes de régulation.

En effet, le métabolisme de la méthionine, est fortement régulé, la régulation de son métabolisme se faisant à plusieurs niveaux (Weissbach et al., 1991, Mol. Microbiol., 5, 1593-1597) :

- métabolisme carboné pour la fabrication de la L-sérine à partir du glycerate3P, de la L-homosérine à partir de l'aspartate et de l'acétyl-CoA
- métabolisme du soufre pour la fabrication de la L-cystéine à partir de la L-sérine, de l'acétyl-CoA et du sulfate du milieu de culture
- 10 - synthèse de la méthionine (Fig. 1) à partir de la L-homosérine, de la cystéine et d'acétyl-CoA ou succinyl-CoA.

La demande WO 93/17112 décrit les différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse de la méthionine à partir de l'acide L-aspartique dans divers organismes. Cette demande de brevet décrit également l'introduction dans un microorganisme de  
15 plusieurs gènes exogènes agissant vde manière séquentielle pour la synthèse de la méthionine, employant du mléthyl-mercaptan ou du sulfure d'hydrogène comme source de soufre.

La présente invention se rapporte à des souches de microorganismes en  
20 particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmércapto)butyrique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de  
25 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrölyle, pyrazölyle, triazölyle, tetrazölyle, thiazölyle, ou thienyle,

par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,



les dites souches présentant au moins une un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

Par enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée, on entend selon l'invention toute enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides 2-amino-4-  
5 (alkylmercapto)butyriques de formule générale (I) par conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

10 soit par conversion directe du substrat en acide de formule générale (I),  
soit par conversion du substrat en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

15 Les enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée sont des enzymes modifiées par rapport aux enzymes natives pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) au lieu de la réaction catalysée par l'enzyme native. Cette modification, appelée encore mutation,  
20 consiste essentiellement en ce que l'enzyme modifiée ait une plus grande affinité pour le composé soufré de formule générale (II) que pour son co-substrat naturel.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment les  
25 différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels du  
30 composé de formule générale (I) qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de métaux alcalins comme le sodium.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle ou t-butyle. De manière plus préférentielle, R représente le radical méthyle.

- 5 L'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est de préférence la L-méthionine.

L'utilisation d'une source de carbone simple et d'un composé soufré de formule (II) pour la production d'acide de formule (I) par bioconversion présente *a priori* plusieurs avantages, notamment :

- 10 - la synthèse de l'acide (I), comme la méthionine, en une ou deux étapes à partie à partir d'O-acyl-L-homosérine, devient indépendante de la synthèse de la cystéine voire également du cycle du tétrahydrofolate ;
- les composés soufrés de formule (II), comme le méthyl-mercaptan, qui sont
- 15 des matières premières généralement toxiques issues de la pétrochimie, peuvent être valorisés dans la synthèse d'acides aminés à haute valeur ajoutée.

L'invention est basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de la cystationine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9 ; GenBank AAN83320, ou AAA24167) en présence de méthyl-mercaptan.

20 Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metB* chez *E. coli* (Fig. 2) et *C. glutamicum*, présente une activité pour un large spectre de substrats (Flavin, M. ; Slaughter, C. (1967) Enzymatic synthesis of homoserine or methionine directly from O-succinyl-homoserine. Biochim. Biophys. Acta 132: 400-405).

25 L'invention est aussi basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de l'O-acétyl-L-homosérine sulfhydrolase (ou O-acétyl-L-homosérine sulfhydriylase, C 4.2.99.10) en présence de méthylmercaptan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metY* chez *C. glutamicum* (Genbank AF220150), présente une activité pour un

30 large spectre de substrats (Smith IK, Thompson JF. (1969) Utilization of S-methylcysteine and methylmercaptan by methionineless mutants of Neurospora and the pathway of their conversion to methionine. II. Enzyme studies. Biochim Biophys Acta 184(1):130-8).

L'invention concerne donc également un procédé de préparation des souches selon l'invention et leur utilisation dans un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I), de préférence de la L-méthionine.

Le procédé de préparation de souches selon l'invention consiste à obtenir, à partir d'une souche bactérienne initiale, une souche bactérienne génétiquement modifiée présentant au moins une modification dans un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase », ledit procédé comprenant une étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne initiale à une pression de sélection en présence du composé de formule (II) défini ci-dessus, afin de diriger une évolution dudit gène codant pour ladite enzyme à activité « méthionine synthase » dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée par rapport à ladite souche bactérienne initiale.

Une activité « méthionine synthase » est améliorée dans la souche (A) de microorganisme par rapport à la souche (I) initiale lorsque la production de méthionine dans les mêmes conditions de culture (dans un milieu contenant une quantité efficace de dérivé soufré de formule (II)) est supérieure pour la souche (A) que pour la souche (I). Cette amélioration est préférentiellement observée par étude de la quantité de méthionine produite. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (A) par rapport au taux de croissance de la bactérie (I), dans un milieu minimum ne contenant pas de méthionine.

La présente invention concerne également les souches à activité « méthionine synthase » améliorée susceptibles d'être obtenues par le procédé de sélection selon l'invention et comprenant au moins un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment et ci-après.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I). Dans ce cas, la source de soufre est un

composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R défini précédemment.

L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine-γ-synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- 5 Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)



- laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée. Dans ce cas, la source de source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène, préférentiellement du sulfure d'hydrogène. La source de soufre H<sub>2</sub>S peut-être introduite dans le milieu de culture ou bien être produite par la bactérie à partir d'une source de soufre simple, par exemples un sulfate.

- 15 L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est avantageusement choisie parmi les cystathionine-γ-synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- L'homme du métier saura sélectionner d'autres enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée en fonction de leur capacité à évoluer pour effectuer la réaction enzymatique « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment. On citera notamment les cystéines synthases A et B, codées par les gènes cysK et cysM chez les bactéries.

- Pour les cystathionine-γ-synthases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-acétyl-L-homosérine ou la O-succinyl-L-homosérine, de préférence la O-succinyl-L-homosérine.

- 25 Pour les acylhomosérine sulfhydrylases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-succinyl-L-homosérine ou la O-acétyl-L-homosérine, de préférence la O-acétyl-L-homosérine.

- Pour ces deux enzymes, la modification consiste essentiellement en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III) se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

- 30 La mutation des enzymes peut être obtenue par la mise en œuvre du procédé de préparation de souches à activité « méthionine synthase » améliorée selon

l'invention par culture sous pression de sélection en présence du composé de formule générale (II).

Dans ce cas, le gène comprenant la séquence codant pour la cystathionine- $\gamma$ -synthase ou l'acylhomosérine sulphydrylase est

- 5     • soit un gène natif, présent dans le génome de la souche initiale (I) où il est exprimé pour permettre la traduction de l'enzyme correspondante,
- soit un gène hétérologue comprenant une séquence codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase ou une acylhomosérine sulphydrylase, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans la
- 10    souche initiale (I) où il aura été introduit.

La mutation peut également être obtenue par mutagenèse dirigée,

- soit directement sur le gène natif présent naturellement dans la souche initiale (I), notamment par recombinaison homologue,
- soit par des techniques usuelles de mutagenèse dirigée sur des séquences codant
- 15    pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase ou une acylhomosérine sulphydrylase, introduite ensuite dans la souche initiale (I) sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans ladite souche initiale (I) où il aura été introduit.

- 20    De tels éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent des séquences de régulation promotrice, ou promoteurs, en particulier des promoteurs dits promoteurs forts constitutifs chez les microorganismes. De préférence, le promoteur fort constitutif est choisi parmi pTAC-O (SEQ ID N° 1), pLAC-O (SEQ ID N° 2), pTRC-O (SEQ ID N° 3), pTHLA (SEQ ID N° 4),
- 25    promoteurs forts pour lesquels l'opérateur lac a été délété pour les rendre constitutifs.

- De manière avantageuse, les cystathionine- $\gamma$ -synthases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont sélectionnées parmi les cystathionine- $\gamma$ -synthases correspondent au PFAM référence PF01053 et au COG
- 30    référence CPG0626.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection

d'alignements de sequences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

5 Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

10 De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase est la cystathionine- $\gamma$ -synthase de E. coli K12, représentée sur la SEQ ID NO. 6, et les séquences homologues de cette séquence présentant une activité cystathionine- $\gamma$ -synthase et comprenant au moins 80% d'homologie, préférentiellement 90% d'homologie, plus préférentiellement 95% d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la SEQ ID  
15 NO 6.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leur pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST, et notamment les programme BLASTP, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres  
20 indiqués par défaut sur ce site:

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase initiale, avant modification, comprend une séquence d'acide aminés ci-dessous dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

25 dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

30 X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

X9 représente I,V,A,T, de preference I.

De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée, selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

5 A-E-S-L-G-G-V-E-S

De manière avantageuse, la cystathionine  $\gamma$ -synthase initiale, avant modification, comprend également au moins une séquence d'acide aminés ci-dessous dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

10 dans laquelle

X10 représente H,Y,F,L,K, de preference A

X11 représente E,D,K,R,V,I, de preference Y

X12 représente S,A,T,P,G, de preference S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S

15 X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G

X15 représente N,H,Q,S, de preference N

X16 représente P,D,L, de preference P

X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

20 Les acides aminés X1 à X9 correspondent aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine  $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représenté sur la SEQ ID NO 6.

Les acides aminés X10 à X18 correspondent aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine  $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représenté sur la SEQ ID NO 6.

25 Les positions des acides aminés employées ci-dessus et ci-après sont entendues comme étant des positions relatives faites par référence à la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12. L'homme du métier saura bien entendu retrouver les acides aminés correspondants sur d'autres séquences de cystathionine- $\gamma$ -synthases, par l'emploi d'outils usuels d'alignement de séquences. On citera  
30 notamment le programme BLAST, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. L'alignement de séquence pourra être effectué tant au niveau de la protéine (SEQ

ID NO 6) que de sa séquence codante, comme par exemple la séquence codante représentée sur la SEQ ID NO 5.

On peut aussi avantageusement utiliser la recherche avancée de BlastP en affinant la recherche avec un motif (PHI-BLAST). Dans ce cas on pourra prendre le motif [AGS]-[EVPT]-[STN]-**L-G**-[GDAHT]-[VATHN]-[ERKF]-[ST]-[LIVA]-[IVAT] pour une première zone conservée et le motif x(2)-Y-[SATPG]-**R**-x(2)-[NHQS]-[PDL]-[TMNGS]-[**RLVSWE**] pour une deuxième zone conservée où les lettres indiquées en gras correspondent aux acides aminés majoritairement présent à cette position dans la séquence, et où x correspond à n'importe quel acide aminé. Le chiffre 2 entre parenthèse signifie qu'il y a deux acides aminés indéterminés.

Pour l'alignement des séquences, on peut utiliser les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

Un tel alignement de séquences est représenté sur la figure 5 pour une sélection de différentes cystathionine-γ-synthases.

Elles sont de préférence choisies parmi les cystathionine-γ-synthase (CGS) suivantes :

- Q9ZMW7 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Helicobacter pylori*
- 20 P46807 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Mycobacterium leprae*
- AAO29646 *Xylella fastidiosa* Temecula1
- NP\_638204 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913
- NP\_358970 *Streptococcus pneumoniae* R6
- NP\_126586 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Pyrococcus abyssi*
- 25 NP\_373671 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315
- NP\_418374 *Escherichia coli* K12
- NP\_601979 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
- NP\_343729 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, *Sulfolobus solfataricus*
- NP\_786043 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1
- 30 NP\_719586 *Shewanella oneidensis* MR-1
- CAD30944 *Streptomyces coelicolor* A3(2)
- NP\_696324 *Bifidobacterium longum* NCC2705
- NP\_457953 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi



NP\_539021 *Brucella melitensis*

EAA30199 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Neurospora crassa*

BAC61028 *Vibrio parahaemolyticus*.

- 5 De préférence, la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée telle que définie précédemment, comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

Par mutation, on entend selon l'invention la substitution d'un acide aminé de la séquence native par un acide aminé différent.

- 10 De préférence, la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

- Ces acides aminés peuvent être identifiés par référence à la structure cristalline de la cystathionine- $\gamma$ -synthases de *E. coli*, décrite par Clausen & al. (EMBOJ, Vol. 17, No. 23, pp 6827-6838, 1998).

De manière avantageuse, la mutation dans la partie C-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X2.

- 20 La cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprend avantageusement la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9.

dans laquelle

- 25 X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et X2 représente G,A,L,I,V,F,M, de préférence A.

De manière avantageuse, la mutation dans la partie N-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

- 30 De manière préférentielle, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée, selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

La cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention peut comprendre avantageusement la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18

5 dans laquelle

X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,

X11 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,

X13 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,

X19 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire, et

10 l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire tel que défini précédemment.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée est une cystathionine- $\gamma$ -synthase telle que définie précédemment, modifiée pour permettre la conversion directe de la  
15 O-succinyl-L-homosérine en L-méthionine avec le méthyl-mercaptan comme source de soufre (composé de formule générale (II) dans laquelle R représente le méthyle).

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8. Une séquence d'ADN codant pour cette  
20 enzyme modifiée est représentée sur la SEQ ID NO 7.

La présente invention concerne également les cystathionine- $\gamma$ -synthases modifiées telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'acide nucléique codant pour ces cystathionine- $\gamma$ -synthases modifiées, notamment les séquences  
25 isolées, en particulier les séquences d'ADN et notamment la séquence représentée sur la SEQ ID NO 7, les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant les dites séquences, en particulier les vecteurs comprenant lesdites séquences d'acide nucléique sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée dans un organisme hôte et les  
30 organismes hôtes transformés avec lesdits vecteurs.

De manière avantageuse, les acylhomosérine sulfhydrylases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

- 5 Elles sont de préférence choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases suivantes :
- NP\_785969 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1
  - AAN68137 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas putida* KT2440
  - NP\_599886 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Corynebacterium glutamicum* ATCC
  - 10 13032
  - NP\_712243 acetylhomoserine sulfhydrylase, *Leptospira interrogans* serovar lai str. 56601
  - BAC46370 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110
  - 15 AAO57279 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000.
  - NP\_284520 O-succinylhomoserine sulfhydrolase [*Neisseria meningitidis* Z2491
  - AAA83435 O-succinylhomoserine sulfhydrylase (*P. aeruginosa*)

- 20 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche à activité « méthionine synthase » améliorée comprend une inactivation d'au moins un gène endogène impliqué dans la voie de biosynthèse habituelle de la méthionine.

- Ceci permet de sélectionner les souches qui ont développé le métabolisme alternatif selon l'invention pour la production de méthionine. Il est à noter que l'on
- 25 obtient alors des souches auxotrophes pour la méthionine (e.g. *metE*), qui survivent en raison de leur possibilité à produire cet acide aminé par une voie alternative. Il peut être nécessaire, dans le test de criblage selon l'invention, que de la méthionine soit présente initialement dans le milieu de culture afin de permettre une première croissance des microorganismes.

- 30 Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne comprend une inactivation d'au moins un gène endogène choisi parmi *metB*, *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.

Une mutation du gène *metJ* a été proposée dans JP 2000157267-A/3, pour produire une quantité supérieure de méthionine (voir aussi GenBank E35587). Ce gène code pour une protéine de répression des gènes *met B*, *E*, *L*, *J* et *R* (chez *Salmonella typhimurium*). Son inactivation ou sa modification permet de diminuer le

5      rétrocontrôle par la méthionine.

Le gène *metC* (GenBank M12858), code la cystathionine-β-lyase (EC 4.4.1.8), les gènes *metE* (GenBank AE000458) et *metH* (GenBank J04975) codent la méthionine synthase (EC 2.1.1.13). La méthionine est un acide aminé essentiel à la vie cellulaire. L'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes revient à supprimer la

10      voie habituelle de biosynthèse de la méthionine.

En utilisant les références données sur GenBank pour ces gènes qui sont bien connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées du fait de la

15      synthèse de ces gènes pour d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

La souche à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprenant une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus comprend de préférence au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH*, et/ou du gène *metC*, et/ou du gène *metB*.

20

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I), la souche selon l'invention comprend avantageusement au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* et/ou *metB*, de préférence au moins une inactivation du gène *metE*.

25

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)

30



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée, la souche selon l'invention comprend au moins une inactivation du gène *metC* et/ou *metB*. Elle peut également comprendre une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* endogène. Dans ce cas, l'activité méthylase associée aux gènes *metE* et/ou *metH* est restaurée par l'introduction d'un gène codant pour une enzyme ayant la même activité. Cette enzyme peut avoir été sélectionnée et/ou modifiée pour permettre une amélioration des rendements de synthèse des acides aminés de formule générale (I).

10 Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une modification de l'activité homosérine O-acyltransférase porté par le gène *metA* afin de lui conférer au choix une activité homosérine O-succinyltransférase (EC 2.3.1.46) ou homosérine O-acétyltransférase (EC 2.3.1.11).

Dans un mode particulier, on pourra remplacer ou modifier le gène *metA* de *E. coli*, codant l'enzyme possédant l'activité homosérine O-succinyltransférase (Genbank AAN83396), afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase. Il est connu de l'homme du métier que cette activité est codée par le gène *metA* de *C. glutamicum* (Genbank AF052652). Les protocoles permettant de remplacer le gène *metA* de *E. coli* par le gène *metA* de *C. glutamicum*, ou de modifier la séquence de *metA* de *E. coli* afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase au lieu d'une activité homosérine O-succinyltransférase sont connus de l'homme du métier.

20 De manière similaire on peut remplacer ou modifier le gène *metA* de *C. glutamicum*, codant une activité homosérine O-acétyltransférase, afin d'obtenir une activité homosérine O-succinyltransférase.

25

Toutes les modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées directement sur la souche objet de la pression de sélection, lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre. Alternativement, il est préférable de mettre en œuvre le procédé de criblage selon l'invention sur une souche ne présentant qu'un nombre restreint de modifications, d'obtenir une souche présentant une activité « méthionine synthase » en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptopan, et d'effectuer alors d'autres modifications telles que mentionnées, afin d'augmenter le 'bypass' de la voie classique de synthèse de la méthionine.

30

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes. La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inductible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide réplcatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaison.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne est une souche d'*E. coli*.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche bactérienne est la souche *E. coli* K183, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005. Cette souche comprend un gène exprimant une cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée, l'enzyme comprenant la mutation E325A, décrite précédemment et une inactivation du gène *metE*.

Les souches de microorganismes selon l'invention possèdent une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou l'acylhomosérine sulfhydrylase ; elles sont de préférence sélectionnées et améliorées par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention. Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées (c'est-à-dire présenter une inactivation, une mutation

et/ou la suractivation d'au moins un gène endogène), la modification étant effectuée préalablement ou non à la mise en œuvre du procédé de criblage.

Afin d'accélérer la sélection et l'évolution dirigée des souches pour la production de méthionine en présence de composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan, on peut effectuer les opérations ci-dessous. Le procédé est décrit pour le méthyl-mercaptan. Toutefois, l'homme du métier saura l'adapter avec tout autre composé de formule (II), en particulier l'H<sub>2</sub>S.

a. Coupler la biosynthèse de la molécule d'intérêt à la croissance du microorganisme de telle sorte que la production de cette molécule est nécessaire pour une bonne croissance du microorganisme

Pour cette raison on peut faire le choix de détruire le gène *metE* codant la méthionine-synthase qui produit la méthionine à partir d'homocystéine. Ce faisant la souche devient auxotrophe pour la méthionine.

Le microorganisme, pour vivre en milieu minimum contenant une source de carbone simple et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium, doit donc optimiser la voie de synthèse de la L-méthionine à partir de l'O-acyl-L-homosérine et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium. Une modélisation informatique montre que dans ces conditions il est possible de doubler les rendements théoriques en méthionine (Tableau 1).

Rendements biomasse $Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Rendements méthionine <sup>a</sup> $Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Rendements méthionine <sup>b</sup> $Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
0	0,36	0,74
0,11	0,30	0,62
0,28	0,21	0,42
0,44	0,12	0,24
0,61	0	0

Tableau 1 : rendements théoriques maximums pour la production de méthionine (g de produit/g de glucose) par *E. coli* dans le cas d'une fermentation sur glucose (a) et d'une fermentation sur glucose et méthyl-mercaptan (b) avec un rendement en biomasse constant (cultures continues).

Cependant, lorsque l'on souhaite produire un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique différent de la L-méthionine, il est nécessaire de compléter le milieu en méthionine pour permettre la croissance du microorganisme.

b. Supprimer les régulations, notamment les rétro-inhibitions soit au niveau des enzymes, soit au niveau des gènes afin que la voie de biosynthèse principale soit potentialisée

On peut ainsi supprimer le gène *metJ* codant une protéine répresseur. Par ailleurs, il a été montré que l'homosérine trans-succinylase, codée par le gène *metA*, était rétro-inhibée par la méthionine et la S-adénosylméthionine (Taylor et al., 1966, J. Biol. Chem., **241** : 3641-3642). Il est donc souhaitable de remplacer cette enzyme par une enzyme insensible à la rétro-inhibition (Chater et al, 1970, J. Gen. Microbiol. **63**: 121-131).

10

Un autre objet de l'invention est un test de criblage-identification permettant d'obtenir un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, notamment la L-méthionine, en métabolisant un composé soufré de formule générale (II), en particulier un alkyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S, notamment le méthyl-mercaptan.

15

Ainsi, la présente invention permet d'identifier des souches présentant des mutations dans leur génome, lesdites mutations permettant l'assimilation du composé de formule (II) par ladite souche, et la production dudit acide aminé de formule (I). Lesdites modifications induisent donc une modification/augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite souche. On peut alors accélérer la production de la souche produisant de la méthionine de façon autonome à partir d'une source de carbone simple et de composé de formule (II).

20

Un autre objet de l'invention est donc un procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale, éventuellement génétiquement modifiée, possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I), en particulier de la L-méthionine, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré de formule (II), présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur

25

30



permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV).

5 Ladite souche bactérienne initiale présente éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

L'invention se rapporte également à une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de l'enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou dans le gène de  
10 l'enzyme acylhomosérine sulphydrylase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite enzyme en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan. Une telle souche peut également présenter au moins une autre modification génétique, (inactivation, mutation ou surexpression d'un gène endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

15 La souche selon l'invention est de préférence susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention, et en particulier est obtenue par le procédé selon l'invention.

L'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercaptopro)butyrique de formule (I) définie ci-dessus, dans lequel on  
20 cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que défini précédemment, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) dans un milieu approprié, ledit milieu approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment. De préférence, ledit acide aminé de formule (I) est la  
25 méthionine, plus préférentiellement L-méthionine, et ledit composé soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S.

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

30 La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention (fermentation) est à la portée de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et

40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

La fermentation est généralement conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries  
5 utilisées, contenant au moins une source de carbone simple ainsi que du composé soufré de formule (II).

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in  
10 Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra  
15 ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies ; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de  
20 culture et de production, ainsi que du composé soufré de formule (II) en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

Après fermentation, l'acide aminé de formule (I) est récupéré selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifié.

25 Les techniques de récupération puis de purification des acides aminés de formule (I) dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini précédemment, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)

30 
$$R''-O-(CH_2)_2-CHNH_2-COOH \text{ (III)}$$

dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.

15

## DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : synthèse de la méthionine à partir de l'homosérine, chez les bactéries.

Figure 2 : Schéma de synthèse de la méthionine selon l'invention appliqué dans *E. coli* ; une stratégie équivalente est transposable chez de nombreux microorganismes dont *C. glutamicum*. Les stratégies *metB\** ou *metY\*\** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins  $\Delta(\text{metE})$  tandis que les stratégies *metB\*\** ou *metY\** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins  $\Delta(\text{metC})$ .

20

### Légende :

MetA : homosérine succinyltransferase ; pourra être remplacé par une isoforme insensible à la rétro-inhibition par la méthionine ou par une isoforme homoserine acetyltransferase éventuellement insensible à la rétro-inhibition par la méthionine.

25

MetB : cystathionine  $\gamma$ -synthase

MetB\* : cystathionine  $\gamma$ -synthase évoluée en « méthionine synthase »

MetB\*\* : cystathionine  $\gamma$ -synthase évoluée en homocystéine synthase

30

MetY\* : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en homocystéine synthase

MetY\*\* : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en « méthionine synthase »

La voie centrale représente la voie naturelle de synthèse de la méthionine chez *E. coli*. Les autres voies indiquées correspondent aux procédés selon l'invention.

5 Figure 3 : représentation d'un mécanisme de fermentation continue pour la sélection dirigée des souches selon l'invention. Nous utilisons par exemple la technologie « Fedbatch-Pro » de la société DASGIP. Il s'agit d'un système modulaire contrôlé par ordinateur permettant la fermentation en parallèle de microorganismes en ayant un control de l'alimentation en milieu, en pH et pO<sub>2</sub>.

10 Figure 4 : Comparaison de spectres de <sup>13</sup>C-RMN, correspondant au carbone 5 de la méthionine, obtenus par HSQC sur un hydrolysats de la souche sauvage (haut) ou de la souche K1a-F optimisée (bas). On observe que le carbone 5 de la souche K1a-F n'est pas marqué au carbone 13 ce qui confirme qu'il provient du méthylmercaptide de sodium

15 Figure 5 : Alignement de séquences non modifiées de cystathionine-γ-synthases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN

(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>)

Figure 6 : Alignement de séquences non modifiées de acylhomosérine sulphydrylases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN.

20 Figure 7 : Cinétique de croissance de la population *E. coli* Δ(metC) lors de son ensemencement initial (culture N°1) et lors de son dixième repiquage (Repicage 10).

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Construction de la souche Δ(metE)

25 L'inactivation du gène *metE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

30 Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la stratégie:

- DmetER de 100 bases (SEQ ID NO 9):

tacccccgacgcaagttctgcgccgcctgcaccatgttcgccagtgccgcgcgggttctggccagccgcgcg  
ttttcagCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4012903 à 4012824) du gène *metE* (séquence 4010643 à 4012904, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- 5        une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645)

- DmetEF de 100 bases (SEQ ID NO 10):

- 10        tgacaatattgaatcacaccctcggtttccctcggttgccctgcgtcgagctgaaaaagcgcaagaagtt  
attggTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4010644 à 4010723) du gène *metE*

- 15        une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DmetER et DmetEF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans  
20        laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metER et metEF.

- MetER (SEQ ID NO 11) : ggtttaagcagtatggtgggaagaagtcgc (homologue à la  
25        séquence de 4012978 à 4012949)

MetEF (SEQ ID NO 12) : cccggggatgaataaacttgccgccttccc (homologue à la séquence de 4010567 à 4010596)

- La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de  
30        la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

**Exemple 2 : Modification de la souche  $\Delta(\text{metE})$  pour la production de méthionine à partir de méthyl-mercaptan**

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptan, on effectue une sélection dirigée en flacons.

La souche *E. coli* K12 est préalablement rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE*, préparée selon les conditions de l'exemple 1 ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptan.

La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » modifiée en présence de méthyl-mercaptan.

La sélection dirigée est conduite en flacon en verre hermétiquement fermé contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* **270** : 88-96) en présence de 33 mM glucose, et du chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l.

Les milieux de culture sontensemencés avec la souche *E. coli* K12  $\Delta\text{metE}$  à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metB*, permettant d'assimiler le méthyl-mercaptan. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en méthionine sur milieu minimum supplémenté en méthionine.

Trois flacons reçoivent alors 100  $\mu\text{L}$  d'une solution à 400 mg/L de sodium mercaptide, tandis qu'un quatrième flacon ne reçoit pas de sodium mercaptide. Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  est mesurée. Les résultats sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Mesure de la densité optique de milieux de cultures pour *E. coli* en présence (flacons 1-3) ou absence (flacon témoin) de sodium mercaptide.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon Témoin
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à T=0	0.34	0.34	0.34	0.34
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à T=6 jours	0.23	1.14	0.79	0.32

Ces résultats montrent que les flacons 2 et 3 ont permis de multiplier une souche capable d'utiliser le méthyl-mercaptop pour produire la méthionine nécessaire à sa croissance (augmentation de la densité optique).

5 L'activité « méthionine synthase » améliorée observée provient d'une modification dans le gène de la cystathionine  $\gamma$ -synthase de la souche *E. coli* K12  $\Delta metE$ , contenue dans les flacons 2 et 3.

La population bactérienne du Flacon 2 peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité « méthionine synthase » en présence de méthyl-mercaptop, en utilisant un procédé de criblage et amélioration par fermentation en étage, ou en  
10 recommençant le procédé en flacon tel qu'il vient d'être décrit.

### **Exemple 3 : Criblage et amélioration par fermentation en étage**

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptop, on effectue une sélection.

15 La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » améliorée en présence de méthyl-mercaptop.

Alternativement, on peut utiliser une souche obtenue selon l'exemple 2.

La sélection dirigée est conduite dans un système en continu en étage (Figure  
20 3).

Le premier fermenteur produit les bactéries à une vitesse proche du taux de croissance maximum. Les bactéries passent en continu de ce fermenteur dans un second fermenteur caractérisé par un taux de dilution plus faible et un milieu avec le crible de sélection (ici, le méthyl-mercaptop).

25 La pression de sélection, imposée à la bactérie dans le second fermenteur, est établie par la concentration en méthyl-mercaptop. Des cycles successifs de sélection permettent d'appliquer aux bactéries des cribles de plus en plus fort par des concentrations croissantes en méthyl-mercaptop.

Pour chaque concentration, la souche sélectionnée dans le second fermenteur  
30 est celle qui a évolué pour métaboliser la totalité du méthyl-mercaptop (méthyl-mercaptop résiduel nul dans le fermenteur).

Dans ce cas, on recommence la sélection en utilisant le fermenteur n°2 comme fermenteur de croissance et le fermenteur n°1 comme fermenteur de crible, présentant du méthyl-mercaptan de concentration plus forte qu'à l'étape précédente.

On effectue différents cycles de sélection pour obtenir une souche fermentant le méthyl-mercaptan avec une vitesse élevée. L'analyse de cette souche permet de définir les mutations dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase.

#### **Exemple 4 :**

La population d'*E. coli* K12  $\Delta$ metE issue du flacon 2 de l'exemple 2 a subi des repiquages successifs en flacon. La nouvelle population obtenue K1a-F est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* **270** : 88-96) contenant 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose entièrement marqué au carbone 13 et du méthylmercaptide de sodium (200 ppm) non enrichi en carbone 13. Cette population est auxotrophe pour la méthionine en l'absence de méthylmercaptide de sodium.

Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le carbone 5 de la méthionine, qui provient, soit de la L-cystéine, produite à partir du glucose présent dans la solution (voie classique), soit du méthylmercaptide de sodium lorsque la nouvelle voie métabolique selon l'invention est utilisée.

L'expérience est conduite de manière similaire avec la souche sauvage *E. coli* K12 (produisant la méthionine à partir du glucose), en absence de méthylmercaptide de sodium.

La figure 4 montre deux spectres 1D, issus de deux acquisitions distinctes, superposés pour une meilleure lecture. Ces spectres 1D sont extraits de spectres RMN à deux dimension type HSQC (corrélation entre protons et carbone 13). Les spectres RMN à deux dimensions ont été obtenus sur un hydrolysats acide des bactéries.

L'échantillon analysé est un hydrolysats total ; cependant du fait de la sensibilité de la RMN et des temps d'acquisition utilisés, on détecte essentiellement les acides aminés, les sucres, les bases et le glycérol. Chaque carbone (couplé à un proton) de chaque acide aminé donne une résonance magnétique nucléaire.



Le carbone 5 de la méthionine (c'est à dire le groupe méthyl terminal) présente un déplacement chimique d'environ 14,7 ppm. La figure 4 présente la zone de déplacement chimique centrée autour de 14,7 ppm pour les deux souches.

On remarque que dans le cas du spectre supérieur, le signal du carbone 5 est fort, indiquant que le carbone 5 est marqué au carbone 13. En conséquence, ce carbone 5 provient du glucose marqué introduit comme substrat dans le milieu de culture.

On remarque par contre que le même signal est très faible dans le spectre inférieur (souche K1a-F). Cela signifie que le carbone 5 n'est pratiquement pas marqué. Pourtant les autres carbones de la molécule sont fortement marqués (résultats non présentés). Le carbone 5 non marqué ne provient donc pas du glucose mais du méthyl-mercaptan.

On peut donc conclure que la souche K1a-F produit de la méthionine à partir de succinyl-L-homosérine et de méthylmercaptide de sodium.

15

#### **Exemple 5 :**

La population K1a-F subit 14 nouveaux cycles de repiquage successifs en flacon. On obtient ainsi la population K144 que l'on étale alors sur milieu minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boîtes inoculées sont placées en condition aérobie dans une jarre anaérobie dans laquelle est introduit un tube contenant du méthylmercaptide de sodium dissout dans de l'eau, la jarre est alors placée dans un incubateur à 37°C. La température d'ébullition du méthylmercaptide de sodium étant de 5°C, l'atmosphère de la jarre anaérobie s'enrichit en méthylmercaptan. Après 4 jours, les clones apparaissent sur les boîtes ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la méthionine en présence de méthylmercaptan. Dix clones sont isolés, dont le clone K176. Le clone K176 est multiplié en culture liquide et des stocks glycérols sont réalisés portant le numéro K183.

Le clone K183 est envoyé au séquençage en même temps que la souche E. coli K12  $\Delta(\text{metE})$  initiale. Pour chaque clone la séquence des gènes *metJ* et *metB* (SEQ ID N°7) est déterminée. La séquence obtenue pour *metB* permet d'observer la présence d'une alanine en position 325 (SEQ ID N°8) en remplacement d'un

30

glutamate (SEQ ID N°6). Le gène *metJ* ne présente aucune mutation. Cette souche a été déposée à la CNCM le 2 avril 2003, sous le numéro I-3005.

#### **Exemple 6 :**

- 5 Le clone K183 est cultivé en flacon, en milieu minimum avec glucose et methylmercaptide de sodium pour seule source de carbone. En parallèle, une culture est réalisée dans des conditions identiques avec la souche *E. coli* K12 sauvage. On observe que la consommation de glucose par g de biomasse est deux fois plus importante que pour une souche de *E. coli* sauvage. La surconsommation est  
10 probablement due en partie à la production d'acétate.

Souches	Rendement Biomasse	Rendement Acétate
MBM01	0.45	<0.002
K183	0.24	0.36

Comparaison du rendement de biomasse entre la souche *E. coli* sauvage et le clone évolué K183 :

Rendement Biomasse exprimé en  $\text{g}(\text{biomasse})/\text{g}(\text{glucose})$ .

- 15 Rendement Acétate exprimé en  $\text{g}(\text{acetate})/\text{g}(\text{glucose})$ .

L'analyse des métabolites intracellulaires et extracellulaires de ces deux cultures montre notamment :

- En intracellulaire, une augmentation de l'alanine, du pyruvate, du ketobutyrate et de 2 ketoisocaproate et une diminution de la concentration en  
20 tryptophane, norvaline, norleucine, leucine et méthionine.

En extracellulaire, une accumulation de glutamate, d'isoleucine, thréonine, valine et 2-ketoisocaproate et une diminution de pyruvate, norleucine, tryptophane.

- Exemple 7 : Caractérisation de l'activité spécifique « méthionine synthase**  
25 **» des souches MBM01 et K183 en présence de méthylmercaptan.**

Afin de montrer l'amélioration de l'activité méthionine synthase dans la souche K183 par rapport à la souche sauvage (MBM01), des réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant des extraits acellulaires préparés à partir de cultures des souches K183 et MBM01 réalisées sur riche (milieu BH1, commercialisé par DIFCO,

avec 2,5 g/L de glucose) en absence de méthylmercaptan. Les extraits protéiques sont désalés sur PD10 et réservés sur glace.

#### **Conditions réactionnelles et traitement de l'échantillon**

- 5 - Préparer sur la glace une solution de sodium methanethiolate diluée 10 fois (100  $\mu$ l de solution 3M plus 900  $\mu$ l d'eau mQ)
- Préparer sur la glace les mélanges réactionnels constitué de 20 $\mu$ L de tampon phosphate 500 mM pH 6.5, 10 $\mu$ l Pyridoxal phosphate 2,5 mM, 16  $\mu$ L O-succinylhomosérine 25 mM, 10  $\mu$ L Sodium methanethiolate 0,3 M, 24  $\mu$ L eau milliQ.
- 10 - placer les tubes à 37°C (thermomixer sous la hotte) et ajouter l'extrait protéique (20  $\mu$ l) pour démarrer la réaction.
- Pour arrêter la réaction (0 à 30 minutes), placer les tubes sur glace et ajouter 400  $\mu$ l d'acétone à -20°C.
- placer les tubes à -20°C pendant 30 minutes
- 15 - puis ouvrir les tubes sous la hotte pendant 10 minutes pour évaporer le méthaneithiol et l'acétone (les maintenir sur glace)
- centrifuger 5 minutes à 10000 g (petite centri), transvaser le surnageant (~100  $\mu$ L) dans des tubes éppendorf et diluer pour un volume final de 1 mL.

#### **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de succinate libéré du succinylhomosérine :**

- Dix  $\mu$ l de l'échantillon ci-dessus obtenu sont analysés par chromatographie ionique en utilisant un Appareil Dionex DX-500 équipé d'une précolonne AG-11 2 mm et d'une colonne AS-11 2 mm, d'un supprimeur ASRS Ultra, d'une boucle injection 10  $\mu$ l. Un gradient est alors appliqué : 0 – 7 min 0,5 mM KOH ; 7 min injection ; 7 – 9,5 min 0,5 mM KOH ; 9,5 – 13 min 0,5 – 5 mM KOH ; 13 – 25 min 5 – 38,3 mM KOH.

#### **Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de methionine synthétisée en présence de methylmercaptan**

- L'analyse est réalisée par GC-MS ce qui nécessite de silyler les échantillons
- 30 préalablement à l'injection. Pour cela chaque échantillon reçoit un standard interne (serine13C) qui permet de valider la qualité de la silylation. Les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant la nuit.

La dérivation est réalisée en appliquant le protocole suivant :

Ajouter 400  $\mu$ l de la solution d'hydroxylamine (0,250g +/- 0,002 g dissous dans 10 ml de Pyridine) à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et fermer correctement les tubes. Mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 2 fois 10 secondes. Concentrer le milieu réactionnel au fond du tube par centrifugation (maxi 1 minute à 5000 g) et laisser réagir 1 heure 30 à 30°C. Ouvrir les tubes et ajouter 1000  $\mu$ l de solution de BSTFA à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et compléter avec 100 $\mu$ l de Pyridine (pipette automatique de 200  $\mu$ l). Refermer les tubes, vortexer pendant 10 secondes et mettre à incuber respectivement pendant 60 minutes à 60°C dans le cas des dérivés TBDMS et 30 minutes à 70°C pour le BSTFA. Si nécessaire filtrer les échantillons sur filtre à usage unique avec membrane PTFE de 0,22  $\mu$ m ou centrifuger à 5000 g pendant 5 minutes. Transférer dans un flacon de 1,5 ml, sertir et injecter en CPG.

Les analyses ont été réalisées avec l'appareil Agilent technologies GC6890/MSD5973 équipé d'une colonne apolaire (HP-5MS, Bios Analytique). Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 ml.min<sup>-1</sup>. L'injection de 1  $\mu$ l d'échantillon a lieu en mode splitless avec un débit de purge de 50 ml.min<sup>-1</sup> pendant 0,85 min. Le profil de température est le suivant : la température initiale de 90°C est maintenue pendant 2 minutes puis augmente jusqu'à 320 °C avec une pente de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Cette température est maintenue pendant 6 minutes. La détection se fait par spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique en mode balayage dans une gamme variant de m/z = 40 à 550 amu. Le délai de passage de solvant est réglé à 3,10 minutes.

### Résultats

Dans ces conditions, une activité « méthionine synthase » a pu être dosée dans les échantillons incubés avec le méthaneethiol, via la quantification d'une part, du succinate par chromatographie ionique et d'autre part, de la méthionine par GC-MS.

Souche	Culture	Extrait protéique	Concentration en protéines	Activité spécifique (mUI/mg protéines)	
				Dosage Succinate	Dosage Méthionine
MBM01	FB 137/P2	Z63	3,43	0,30	0,23
K183	FB 140/P2	Z64	3,62	1,40	1,72

On observe donc que l'activité méthionine synthase en présence de methylmercaptan est renforcée dans la souche évoluée par rapport à la souche sauvage confirmant que la cystathionine  $\gamma$ -synthase mutée (E325A) a une activité méthionine synthase modifiée.

**Exemple 8 : Construction de la souche  $\Delta(metC, metJB)$  puis sélection d'un gène *metY* évolué.**

10 **Construction des souches MG1655 ( $\Delta metC::Cm$ ) et MG1655 ( $\Delta metC$ )**

Pour inactiver le gène *metC* la stratégie de recombinaison homologue décrite par Datsenko & Wanner (2000) est utilisée. Cette stratégie permet l'insertion d'une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie du gène concerné. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides :

15 Pour *metC* :

- DmetCR de 100 bases (SEQ ID NO 13):

ccggcggtccagatcggcaatcagatcgtcgacatcttcagaccaatatgcaggcgaatcaaggtcccgctaa  
aatcgatCATATGAATATCCTCCTTAG

avec

20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3151419 à 3151359) du gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko,

25 K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

- DmetCF de 100 bases (SEQ ID NO 14) :

cggacaaaaagcttgatactcaactggtgaatgcaggacgcagcaaaaaatacactctcggcgcggttaaatag  
cgtgattTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3150255 à 3150334) du gène *metC*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol.

- 5 Les oligonucléotides DmetCR et DmetCF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est ensuite introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et
- 10 l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metCR et metCF. La souche retenue est nommée MG1655 ( $\Delta metC::Cm$ ).

MetCR (SEQ ID NO 15): cgtccgggacgccttgatcccgacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

- 15 MetCF (SEQ ID NO 16) : gcgtttacgcagtaaaaaagtcaccagcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

- La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches
- 20 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche retenue est nommée MG1655 ( $\Delta metC$ ).

#### Construction de la souche MG1655 ( $\Delta metB$ - $\Delta metJ$ )

- 25 Pour déléter les gènes *metB* et *metJ*, nous avons inséré une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie des gènes concernés. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides.

Pour *metBJ* :

- MetJR de 30 bases (SEQ ID NO 18):

- 30 ggtacagaaaccagcaggctgaggatcagc

homologue à la séquence (4125431 à 4125460) en aval du gène *metJ* (séquence 4125975 à 4125581, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- DmetJBF de 100 bases (SEQ ID NO 17) :

tatgcagctgacgaccttcgccctgcctgcgcaatcacactcatftttacccttggttcgagcccggaagccat  
tttcaggcaccagagtaaacatt

avec

5 une partie homologue (caractères majuscule) à la séquence (4126217 à 4126197) entre les gènes *metJ* et *metB* (séquence 4126252 à 4127412) contenant la région promotrice de l'opéron *metBLF*.

une partie homologue (caractères minuscule) à la séquence (4127460 à 4127380) correspondant au début du gène *metL* (séquence 4127415 à 4129847) et à  
10 la fin du gène *metB*.

Ces deux oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier la région concernée sur l'ADN chromosomique de MG1655 ( $\Delta metJ :: Cm$ ) (figure 8).

Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la  
15 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et la délétion de gène *metB* par recombinaison homologue est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetJR et MetLR.

MetJR (SEQ ID NO 18) : ggtacagaaaccagcaggctgaggatcagc (homologue à la séquence 4125431 à 4125460)

20 MetLR (SEQ ID NO 19) : aaataacacttcacatcagccagactactgccaccaaattt (homologue à la séquence de 4127500 à 4127460)

L'évènement de recombinaison homologue peut avoir lieu à deux endroits (figure 9).

Seul le cas B de la figure 9 (ligne inférieure) correspond à la souche souhaitée  
25 MG1655 ( $\Delta metB - \Delta metJ :: Cm$ ) où les gènes *metJ* et *metB* ont été éliminés et le promoteur de l'opéron *metBLF* remplacé devant *metL*.

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches  
30 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetLR et MetJR).

**Construction des souches MG1655  $\Delta(\text{metC}::\text{Cm}, \text{metJB})$  et MG1655  $\Delta(\text{metC}, \text{metJB})$**

Pour déléter le gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) de la souche MG1655 ( $\Delta\text{metB}-\Delta\text{metJ}$ ), nous avons utilisé la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole suivi est réalisé en deux étapes avec la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 ( $\Delta\text{metC}::\text{Cm}$ ) puis transduction dans la souche MG1655 ( $\Delta\text{metB}-\Delta\text{metJ}$ ).

Préparation du lysat de phage P1 :

- 10 - Ensemencement par 100  $\mu\text{l}$  d'une culture de nuit de la souche MG1655 ( $\Delta\text{metC}::\text{Cm}$ ) de 10 ml de LB + Cm 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + glucose 0,2% +  $\text{CaCl}_2$  5 mM
- Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- Ajout de 100  $\mu\text{l}$  de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage MG1655 (environ  $1.10^9$  phage/ml)
- 15 - Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200  $\mu\text{l}$  de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200  $\mu\text{l}$  de chloroforme
- Conservation du lysat à 4°C

20 Transduction :

- Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ( $\Delta\text{metB}-\Delta\text{metJ}$ ) en milieu LB
- Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM
- Tubes témoins : 100  $\mu\text{l}$  cellules
- 25 100  $\mu\text{l}$  phages P1 de la souche MG1655 ( $\Delta\text{metC}::\text{Cm}$ )
- Tube test : 100  $\mu\text{l}$  de cellules + 100  $\mu\text{l}$  de phages P1 de la souche MG1655 ( $\Delta\text{metC}::\text{Cm}$ )
- Incubation 30 min à 30°C sans agitation
- Ajout de 100  $\mu\text{l}$  de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex
- 30 - Ajout de 1 ml de LB
- Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
- Etalement sur des boîtes LB + Cm 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.



- Incubation à 37°C jusqu'au lendemain

#### Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*metC::Cm*) est vérifiée par une analyse PCR avec  
5 les oligonucléotides MetCR et MetCF d'une part et MetJR et MetLR d'autre part afin de vérifier également la souche délétée des gènes *metB* et *metJ*. La souche retenue est dénommée MG1655  $\Delta(\textit{metC}::\textit{Cm}, \textit{metJB})$ .

MetCR (SEQ ID NO 21) : cgtccgggacgccttgatcccggacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

10 MetCF (SEQ ID NO 22) : gcgtttacgcagtaaaaaagtcaccagcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors  
15 introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetCR et MetCF d'une part et MetJR et Met LR d'autre part). La souche retenue est dénommée MG1655  $\Delta(\textit{metC}, \textit{metJB})$ .

#### 20 **Construction du plasmide pTopo-*metY***

Parallèlement un plasmide permettant l'expression du gène *metY* de *C. glutamicum* sera construit. Par exemple, ce gène peut être amplifié par PCR à partir d'ADN chromosomique de *C. glutamicum* puis introduit dans un plasmide. On pourra choisir d'amplifier par PCR le gène *metY* et éventuellement son promoteur naturel.  
25 Dans un mode de réalisation préféré, on clonera le gène *metY* sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression dans *E. coli*. Les vecteurs utilisés pourront être choisis parmi les vecteurs pUC, pBluescript, pTopo, pCR-Script, ... Dans un mode de réalisation particulier, on pourrait utiliser le plasmide pSL191, décrit par Hwang *et al.* (2002) *J. Bact.* 184(5) : 1277-1286, qui comprend le gène *metY* sous le contrôle de son promoteur naturel cloné dans un vecteur navette *C. glutamicum* – *E. coli* pMT1.  
30

La souche *Escherichia coli*  $\Delta(\textit{metC}, \textit{metJB})$  précédemment obtenue est transformée avec un plasmide portant le gène *metY* de *C. glutamicum*. La

transformation de la souche pouvant être réalisée selon l'une des techniques connues de l'homme du métier.

La souche obtenue sera ensuite inoculée dans un Erlen Meyer contenant 10% de son volume en milieu minimum avec glucose pour seule source de carbone. La faible activité succinylhomoserine sulfhydrylase initialement portée par l'enzyme MetY devrait limiter la croissance de la population bactérienne du fait d'une limitation en méthionine synthétisée. Des repiquages sont réalisés tous les 4 jours pendant 1 mois. L'amélioration de l'activité succinylhomoserine sulfhydrylase portée par la protéine MetY devrait se traduire par une synthèse accrue en méthionine ; on devrait donc observer une amélioration du taux de croissance de la population bactérienne entre chaque repiquage, ce qui imposera le cas échéant d'augmenter la fréquence de repiquage afin de maintenir les microorganismes dans une phase de division. On évitera en effet de maintenir trop longtemps les cultures dans une phase stationnaire. Lorsque le taux de croissance se stabilisera d'un repiquage à un autre, on considérera que la souche a suffisamment évolué et la sélection de trois clones sera réalisée. Leur séquençage permettra de déterminer la séquence évoluée *metY\**. Dans cette première étape, l'évolution du gène *metY* aura permis de modifier l'activité O-acetyl-homosérine sulfhydrylase en une activité O-succinyl-homosérine sulfhydrylase permettant de produire de l'homocystéine à partir d'O-succinylhomosérine et d'H<sub>2</sub>S ; ces deux substrats étant produits par la bactérie.

Afin d'optimiser le processus d'évolution de *metY*, une démarche similaire peut-être réalisée en utilisant d'autres mutants d'*Escherichia coli*, on pourra notamment utiliser le mutant  $\Delta(\textit{metC}, \textit{metB})$ .

## **Exemple 9 : Procédé de culture Fed-Batch pour la production et la purification de méthionine.**

### Préculture :

La préculture est réalisée pendant une nuit en fiole de 500 ml contenant 50 ml de milieu minimum type M9 modifié, complété avec 2.5 g/l de glucose. Les cellules sont récupérées par centrifugation et reprises dans 5 ml de milieu minimum type M9 modifié.

### Culture en fermenteur.

La culture est réalisée dans un fermenteur de volume utile de 300ml de type Fedbatch-pro DASGIP.

Le fermenteur est rempli avec 145 ml de milieu minimum type M9 modifié et inoculer avec les 5 ml de préculture. Soit une DO600nm d'inoculation comprise entre  
5 0.5 et 1.2.

La température de la culture est maintenue entre 30 et 37°C et le pH est ajusté en permanence à une valeur comprise entre 6.5 et 8. Il est partiellement régulé par l'ajout d'une solution CH<sub>3</sub>SNa. Une solution de soude 2N peut le cas échéant compléter la régulation. L'agitation est maintenue à entre 200 et 400 rpm pendant la  
10 phase de batch et est augmentée jusqu'à 1000 rpm en fin de fed-batch. La teneur en O<sub>2</sub> dissout est maintenue entre 30% et 40% de saturation en utilisant un contrôleur de gaz. Dès que la OD 600nm à une valeur comprise entre 2.5 et 3 nous commençons le fed-batch par ajout du milieu de fed à un débit initial compris entre 0.3 et 0.5 ml/h avec une augmentation progressive jusqu'à des débits compris entre 2.5 et 3.5 ml/h.  
15 après ce stade le débit est maintenu constant pendant un temps compris entre 24h et 32h. Le milieu de fed est constitué sur la base d'un milieu M9 modifié complétement par une concentration en glucose comprise entre 300 et 500g/l de glucose. Dans le même temps nous complétons le milieu avec une solution de CH<sub>3</sub>SNa (solution entre 1 et 5M) afin de permettre la croissance de la bactérie tout en régulant le pH.  
20 Dès que la concentration cellulaire atteint une concentration comprise entre 20 et 50 g/l nous remplaçons le milieu de fed par un milieu minimum type M9 limité en phosphore. La solution de méthyl-mercaptan est remplacée par une injection directe de CH<sub>3</sub>SH sous forme gazeux dans le fermenteur. Le débit du gaz est adapté au débit de la solution de fed dans des rapports molaires avec le substrat carboné de 1 à 3. Dès  
25 que la concentration cellulaire est comprise entre 50 et 80 g/l la fermentation est arrêtée. Le mout de fermentation est ajusté à un pH compris entre 7.5 et 9 par une solution de NaOH puis chauffé à entre 60 et 80°C. Le mout est ensuite filtré sur des modules UF. La température du jus est maintenue entre 60 et 80°C, puis le jus est concentré avant passage sur charbon pour décoloration (en colonne ou en batch). Le  
30 jus décoloré est de nouveau filtré pour retirer les dernières particules avant d'être acidifié par HCl concentré jusqu'à un pH inférieur à 2.28 (pK<sub>1</sub> de la méthionine). Les cristaux methionine.HCl ainsi formés sont récupérés par filtration, puis l'HCl est éliminé par évaporation pour purifier la L-Méthionine.

**Exemple 10: Production de méthionine avec une souche  $\Delta(\text{metC})$** 

- La construction de la souche  $\Delta(\text{metC})$  est décrite dans l'exemple 7. Dans un mode particulier de l'invention la souche *E. coli*  $\Delta(\text{metC})$  est mise en culture en
- 5 flacon (voir exemple 2) contenant un milieu minimum avec glucose comme seule source de carbone. Le milieu ne contient ni méthylmercaptop, ni  $\text{H}_2\text{S}$ . Des repiquages sont réalisés et les taux de croissances sont déterminés pour chaque repiquage. On observe une très nette amélioration du taux de croissance de la souche  $\Delta(\text{metC})$  sur milieu minimum (Voir Figure n° 7) suggérant que l'activité homocysteine synthase
- 10 portée par la cystathionine  $\gamma$ -synthase s'est fortement améliorée en présence d' $\text{H}_2\text{S}$  endogène.

Cycles de repiquage N°	$\mu$ mesuré ( $\text{h}^{-1}$ )
1	0,05
3	0,37
5	0,39
10	0,44
12	0,44

**Dépôt de matériel biologique**

- 15 La souche K183 a été déposée le 02 Avril 2003 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le Numéro d'ordre I-3005.

### Revendications

1. Souche de microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I)



5 dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle,

10 par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

15 ladite souche comprenant au moins une un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion directe d'un substrat dérivé de formule générale (III)

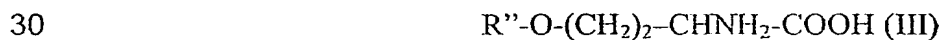


dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en acide aminé de formule générale (I).

3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R.

4. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide aminé de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

5           5.       Souche selon la revendication 4, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène.

6.       Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone.

10           7.       Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est la L-méthionine.

8.       Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le microorganisme est choisi parmi les bactéries.

15           9.       Souche selon la revendication 8, caractérisée en ce que la bactérie est choisie parmi *E. coli* et les corynébactéries.

10           10.      Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine-γ-synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases à activité « méthionine synthase » modifiée.

11.      Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que la modification de l'enzyme consiste en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III) se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

25           12.      Souche selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthases à activité « méthionine synthase » non modifiée est sélectionnées parmi les cystathionine-γ-synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

30           13.      Souche selon la revendication 12, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée est la cystathionine-γ-synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO : 6, et les séquences homologues de cette séquence.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

5 X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

Dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

10 X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

15 X9 représente I,V,A,T, de preference I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

Dans laquelle

X10 représente H,Y,F,L,K, de preference A

25 X11 représente E,D,K,R,V,I, de preference Y

X12 représente S,A,T,P,G, de preference S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S

X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G

X15 représente N,H,Q,S, de preference N

30 X16 représente P,D,L, de preference P

X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

5 X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

Dans laquelle

X1 représente A,G,S, de préférence A

X2 représente E,V,P,T, de préférence E

X3 représente S,T,N, de préférence S

10 X4 représente G,D,A,H,T, de préférence G

X5 représente V,A,T,H,N, de préférence V

X6 représente E,R,K,F, de préférence E

X7 représente S,T, de préférence S

X8 représente L,I,V,A, de préférence L et

15 X9 représente I,V,A,T, de préférence I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

Dans laquelle

X10 représente A, H,Y,F,L,K, de préférence A

25 X11 représente Y, E,D,K,R,V,I, de préférence Y

X12 représente S,A,T,P,G, de préférence S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de préférence S

X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de préférence G

X15 représente N,H,Q,S, de préférence N

30 X16 représente P,D,L, de préférence P

X17 représente T,M,N,G,S, de préférence T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de préférence R.



correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et

X2 représente G, A, L, I, V, F, M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

21. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et

X2 représenté G, A, L, I, V, F, M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- $\gamma$ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

21. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

- 5           23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10           X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,  
X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et  
l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,  
15           les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée  
20           telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation  
25           nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée  
30           produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

- 5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,  
X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et  
l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,  
15 les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée  
20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation  
25 nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine  
sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée  
30 produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- $\gamma$ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

- 5           23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10           X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,  
               X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
               X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,  
               X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et  
               l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,  
 15           les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

- 20           25. Cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

- 25           27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

- 30           28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

de formule (II) défini selon l'une des revendications 1 à 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans

- 5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon l'une des revendications 1 à 7, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon l'une des revendications 1 à 7.

- 10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des  
15 revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé  
20 soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S.

32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)



- 25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des  
30 revendications 1 à 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

- de formule (II) défini selon l'une des revendications 1, 3, 5, 6 ou 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans
- 5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon la revendications 2, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon la revendications 4.
- 10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des
- 15 revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.
30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.
31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé
- 20 soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H<sub>2</sub>S.
32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)
- $$\text{R}''\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH (III)}$$
- 25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyl,
- avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des
- 30 revendications 1 à 7.
33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

34. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.

35. Procédé selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisé en ce que l'enzyme est une cystathionine- $\gamma$ -synthase à activité « méthionine synthase »  
5 modifiée telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.



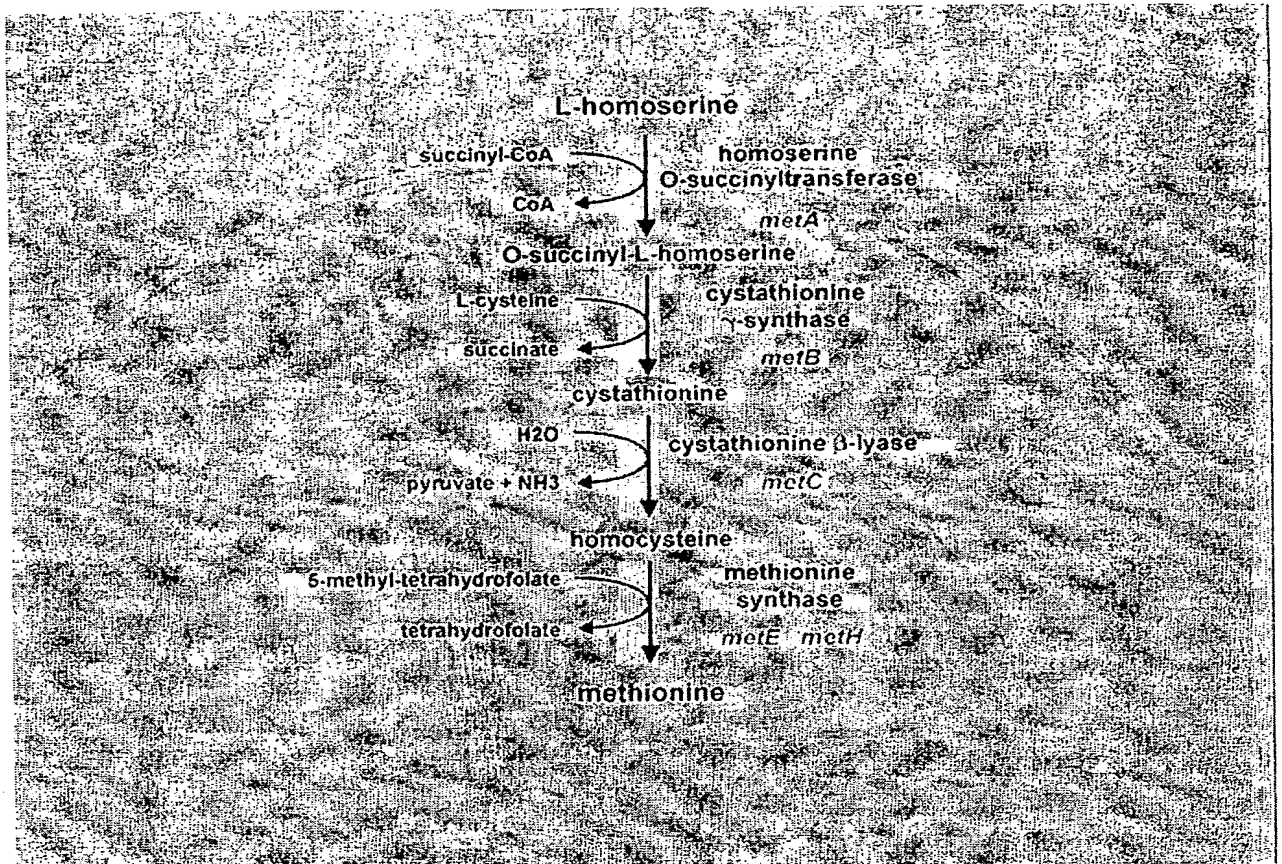


Figure 1

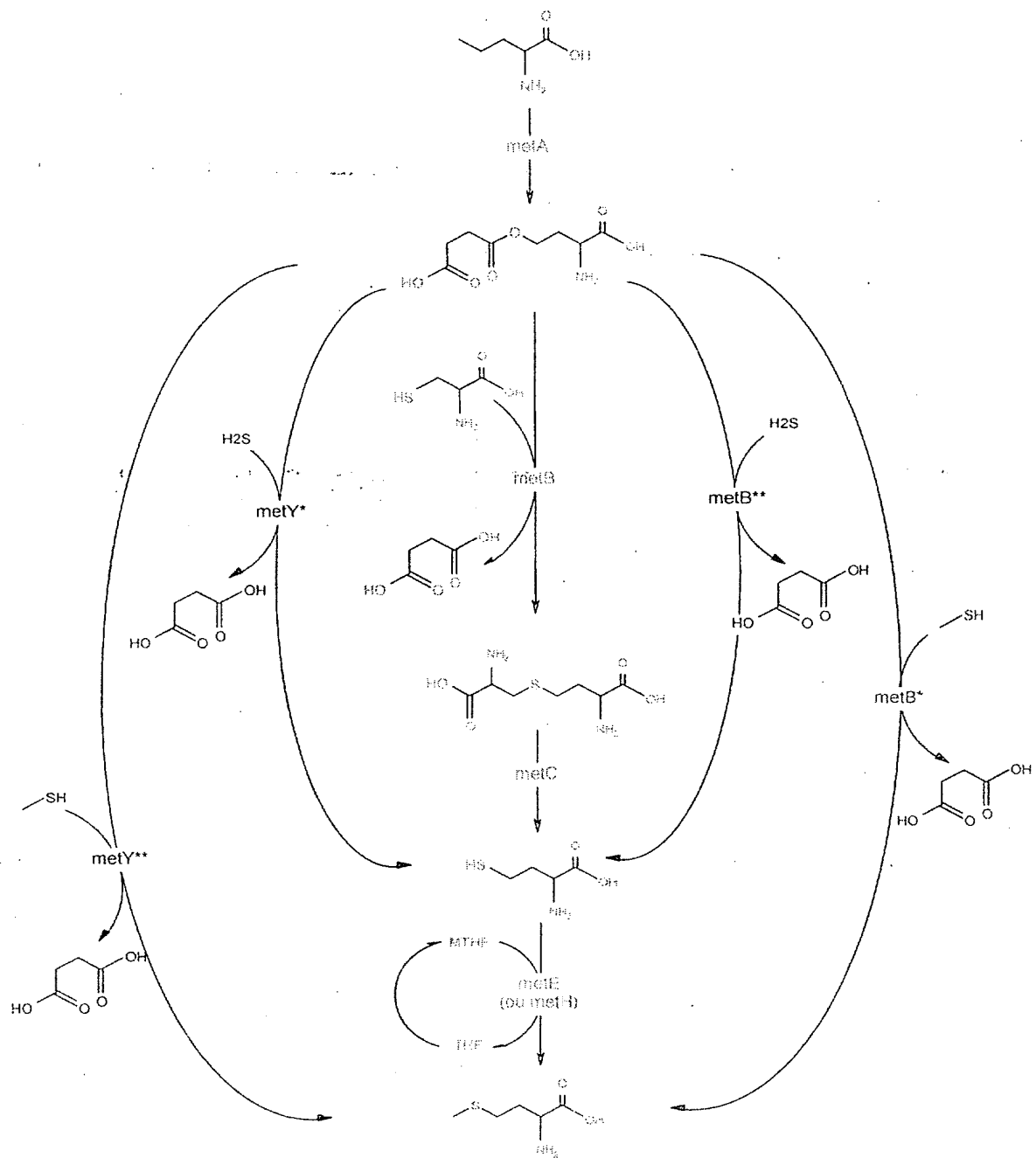


Figure 2

3/10

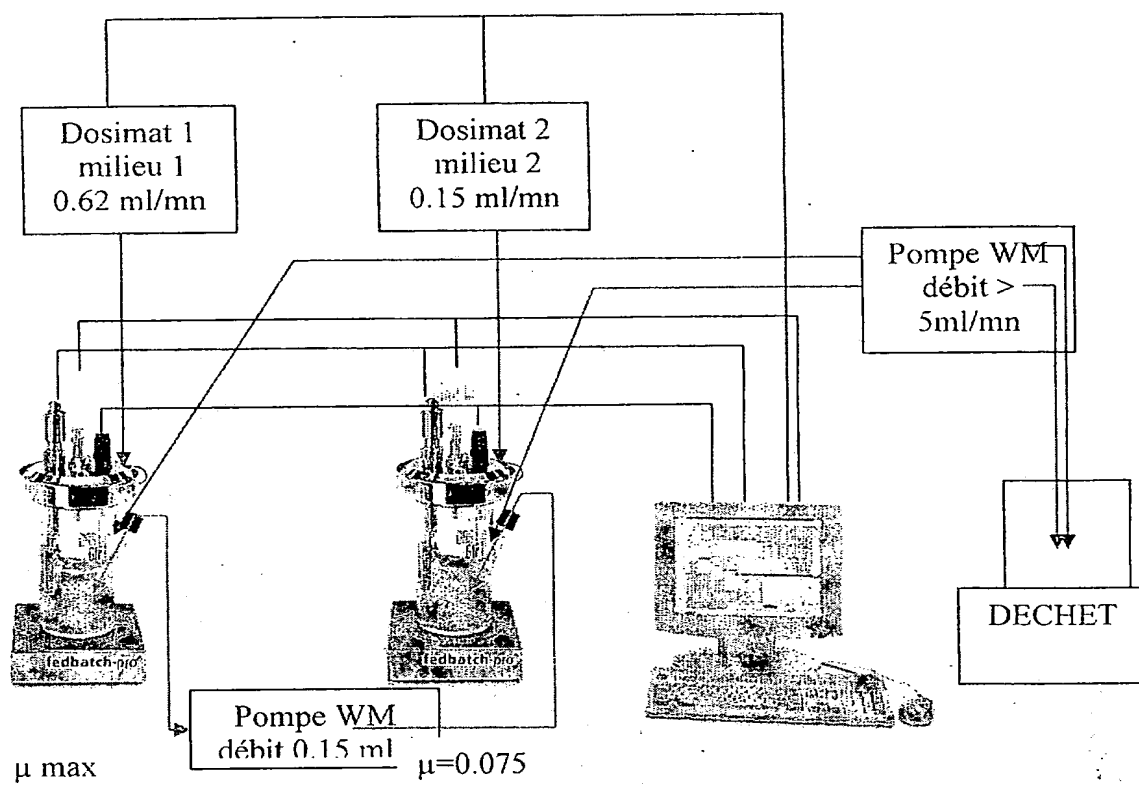


Figure 3

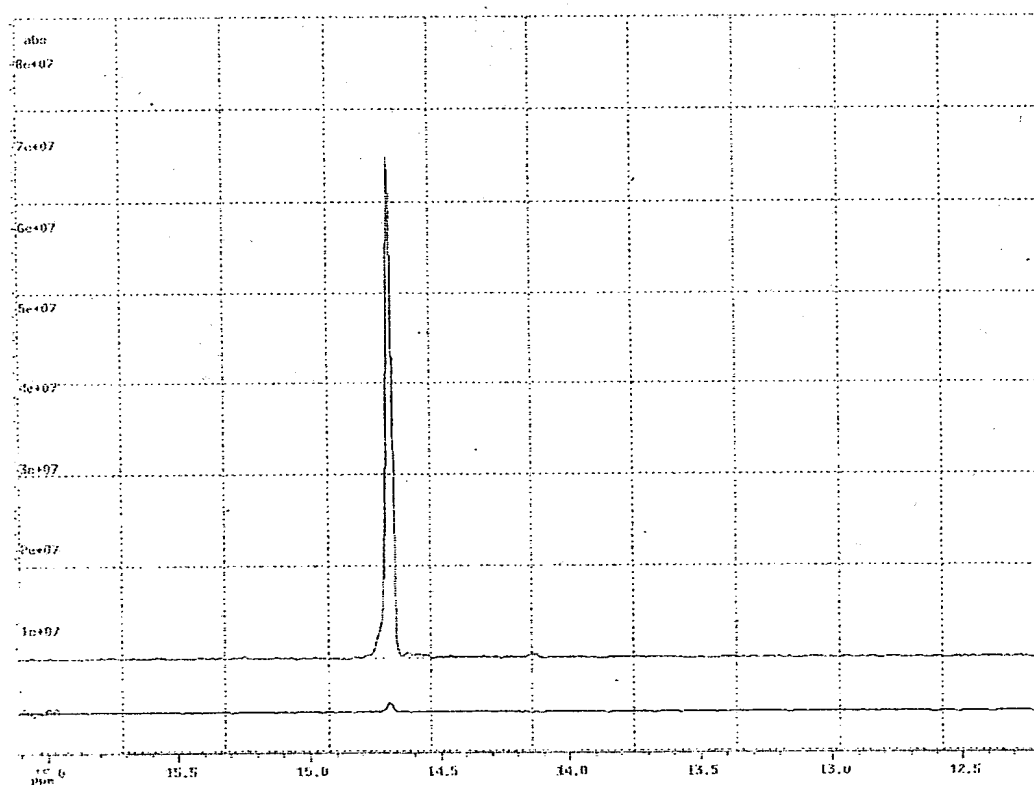


Figure 4

1

101

200

[illegible]

## Figure 5

## Figure 5 (Suite)

562

501

IPALMTHACI PKAQSEAAAGI RDGLVRLSVG IEHEQULLED LDOAQFAKIS  
NP\_373671 Q9ZMW7 PDGLVRLSVG IEDTEGLVDD LKQALDTL  
QPMAMTHASTI TGSQLE---V PDDLVLRLSVG IEDVGDLICD LKQALN  
HPGMMTHASA AGSALE---V PADLVLRLSVG IENADDLALD LQOALG  
VPRAMTHASV AGTLQ---V PANVLRLSVG IENADDLIAD LKQALDRI  
HPASMTHTAM TPEARAKAGI SDGHLRLSVG IEASEDLIVD LVAGLGRAQO  
VPRASMTHTAM TAEARAAAGI SDGLLRLSVG IESADELLID LKAGLARAE  
HPASMTHTAM EPOAFEEAGI KETLLRLSVG IEDADELLAD IQAGLAARVAE  
HAATMTHTAGM APEAPAAAGI SETTLRLSITG IEDGEDLIAD LENGFFRAAN  
HAATMTHTAGM SPQARAAGI SETLRLISITG IEDGEDLIAD LENGFFRAAN  
HPASMTHTAM GEEALAEAGV SHQLLRLSVG LEDAQDLIAD LDOAFYKAA  
YPKVSAKNTL DEETREILGI TDGLLRLSVG IEDPDLIED LNALGVWR  
HPATMTHSRTL SLEBRKIVGI TDSLLRLSVG IEDVNDLIED LORALSTLY  
HPATMTHASGV PDVYKRIVGI LESTLRLSITG IEHPDDLIAD LAQALDAA  
YPTQTHTADI PAEYVHSYGL TDDLRLSITG IEDARDLIAD LRQALEG  
VPAVQTHADL TEEORQSKGI TANLLRLSVG IENSDLAAD LKQALIRATV  
-----RRT PRDRAEVAGV PMTLGRVSVG IEDVELDWE LNASIDKVL  
PYVILLAHYQ- ELDWAEQVGV DNMLTRISVG LSGTDELINV FTRALKVAE  
EBA30199 pa.mtha. ....LRLSITG iE...#Li. l.qal.....  
Consensus

**Figure 5 (fin)**

7/10

1	NP_785969	MTTNPENY	HEETLQVHAG	QTVD-ETGAR	AVPIYQTTTSY	VFKDKAQAG	RFALTDAGNI	YTRLNPTTD	VVDKRVAAL	100	
	NP_712243	MPRNY	KPEITIALHGG	QSPDPSTLSR	AVPIYQTTTSY	VFKNTEHAAK	LFGLQEFENI	YTRIMNPTD	VLEQRMAALE		
	AA068137	M	KLETIAHAG	FSPDPTTRAV	AVPIYQTTTSY	AFDDTQHAG	LFDLKVAGNI	YSRLNPTND	VLEQRMAALE		
	NP_599886:	NP	KYDMSNADQW	QSDVQTSAR	NLPYQSTAF	VFDSEAHAKQ	RFALDLEGPV	YSRLNPTVE	ALENRASLE		
	BAC46370	NP	WMSKSPATY	GFTRILVHSG	TLRS-QFGET	SEALFTTQGY	VYNSAECEA	REKEDGPGFI	YSRYNPTIS	MEERNMIELE	
	AA057279	MTQWDA	GRLDSLEGV	GFTRILAVRAG	QHRT-PEGEH	GDPMFTTSSY	VFTTAADAAA	REAGEVPCNV	YSRYNPTVR	SFEERIAALE	
	AA057279	MTQWDA	GRLDSLEGV	GFTRILAVRAG	QHRT-PEGEH	GEALFTTSSY	VFTTAADAAA	REAGEVPCNV	YSRYNPTVR	TFEERIAALE	
	NP_284520:	MSKKL	HPOTLAIRGG	KEQT-EYREH	NQALFTTSSY	WMDNAQHAAD	LFSSKIKGFT	YTRTAMPPTA	AFEKRIAAL		
	Consensus	.....	..tla.haG	q.....e..	..p..t..s	vf..a.haa	rf.....Gni	Ysr..NPT..	..f..Plaale		
101	NP_785969	HGTAGVTIAT	GSAAITAAIL	NIAQOQDEIV	AANTLYGGTY	DLFSVTLKKL	GITTHEVD-P	DEPANFETAI	NDHTKALIVE	SIGNPGINLV	DEFAIGKIAH
	NP_712243	GGVAAALATAS	QQAETLALL	NIVEAGQEV	ASSLYGGTY	NLLHVTPEKL	GIKHFVD-P	SDPENFRKAV	NDKTRAFAVE	TLGNPKNLTL	NLEATAKVAAH
	AA068137	GGVAAALATAS	QQAETLALL	NIVEAGQEV	ASSLYGGTY	NLLHVTPEKL	GIKHFVD-P	SDPENFRKAV	NDKTRAFAVE	TLGNPKNLTL	NLEATAKVAAH
	NP_599886:	BAC46370	GGVAAALATAS	QQAETLALL	NIVEAGQEV	ASSLYGGTY	NLLHVTPEKL	GIKHFVD-P	SDPENFRKAV	NDKTRAFAVE	TLGNPKNLTL
	AA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279
	NP_284520:	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279	GA057279
	Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
201	NP_785969	DHGIFIVDN	TGTPYLVRP	LEHGADVVH	SATKFIGHG	TTMGVIVEG	GQFDM---RA	SG-KYPDPTT	PDPQYNGLVF	ADLGA---	-----AFTTK
	NP_712243	DSEVPLIIN	TLSPYLVRP	IEHGADVVH	SLTRFLGCHG	TSIGGLIVDS	GRFNW---G	NG-KFKNFTE	PDPYHGLKF	WEVFGKFEFP	GGVNIAYIHK
	AA068137	RHGVLPLVN	TVATPVLCP	FEHGADVVH	SLTRKFIGHG	TSIGGLIVDS	GRFPW---AE	NKERFALLNT	PDPYHGVYTY	TEAFGP---	-----AAFGR
	NP_599886:	RNSVPLIIN	TVATPVLCP	FEHGADVVH	SLTRKFIGHG	TSIGGLIVDS	GRFPW---AE	NKERFALLNT	PDPYHGVYTY	TEAFGP---	-----AAFGR
	BAC46370	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279	KG057279
	AA057279	AKGALLAVDN	CCTPALQOP	LKLGADVVH	SATKFIGHG	TTMGVIVEG	GQFDM---RA	SG-KYPDPTT	PDPYHGLKF	WEVFGKFEFP	GGVNIAYIHK
	NP_284520:	GIGALLAVDN	SLLSPVGSOP	LKLGADVVH	SATKFIGHG	TTMGVIVEG	GQFDM---RA	SG-KYPDPTT	PDPYHGLKF	WEVFGKFEFP	GGVNIAYIHK
	Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
301	NP_785969	VRAETLRDTG	ATISPENSEL	LLOGLESLSL	RVERHVTNTR	KIVAFELKAP	KVAMINYPGL	EDSPYHDLAT	KYFPGCV-GS	IFTLGLTGG	AAGKALIEHL
	NP_712243	AKVQGLRDMG	ASISPENAWQ	ILQGVETLPL	RMRKSENAL	AVAEYLTKHP	KVSWNYPGL	KMDKNYSLAK	KYHKKDLYGA	ILGFGIKGGA	VEAKKFIDGL
	AA068137	CRVPLRNTG	ALSPENAEFL	ILQGVETLPL	RMRKSENAL	AVAEYLTKHP	KVSWNYPGL	KMDKNYSLAK	KYHKKDLYGA	ILGFGIKGGA	VEAKKFIDGL
	NP_599886:	VRVGLRDTG	SLSPENAWA	AVQIGITLPL	RVERHVTNTR	KIVAFELKAP	KVAMINYPGL	EDSPYHDLAT	KYFPGCV-GS	IFTLGLTGG	AAGKALIEHL
	BAC46370	HLNENRQTC	PLSPENAW	LLKGLTILAV	RVRAGTDRAA	SVAEVLNHP	KVSWNYPGL	KMDKNYSLAK	KYHKKDLYGA	ILGFGIKGGA	VEAKKFIDGL
	AA057279	-VVGFLRTAG	PLSPENAW	LLKGLTILAV	RVRAGTDRAA	SVAEVLNHP	KVSWNYPGL	KMDKNYSLAK	KYHKKDLYGA	ILGFGIKGGA	VEAKKFIDGL
	AA057279	-VVGFLRTAG	PLSPENAW	LLKGLTILAV	RVRAGTDRAA	SVAEVLNHP	KVSWNYPGL	KMDKNYSLAK	KYHKKDLYGA	ILGFGIKGGA	VEAKKFIDGL
	NP_284520:	-VAVVCNSCG	LAMSPENAWQ	LLSGVETLPL	RNEKQFDNAL	KIAQMLQAP	QVQAVY:GTL	POHPOHELAR	ROQSGF--GI	VIGFEV-ADQ	AAAWKVVDCV
	Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Figure 6

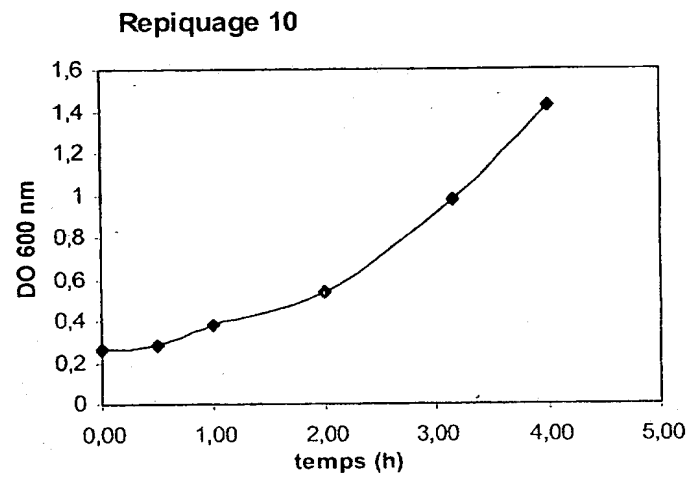
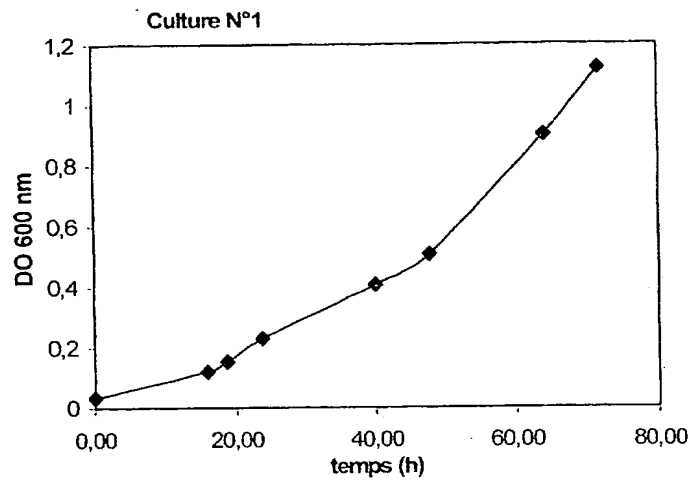
8/10

NP\_785969 QLFSLANVA DAKSLIIHPA STTHAQLNEQ ELLAAGVTPD LIRISVGVEN ADLLIADLDQ ALAQV 467  
 NP\_712243 ELFSLLANVG DAKSLIVHPA STTHOQLRPE EQLSAGVTPD FVRLSVGLEH IECILFDLEE AKKV  
 AAN68137 QIVVRLVNIQ DAKSLACHPA STTHRQLNDD ELEKAGVPRD MVRLSIGIEH SDDIADLAQ ALEASRG  
 NP\_599886: KLRSLANIG DVRLSVHPA TTTHSQSDEA GLARAGVTQS TVRLSVGIET IDDIADLEG GPAI  
 BAC46370 KLAKISNIG DAKSLVHPA TTTHQRLRPE DRALGISEG FIFRSAGLEH ADDLIEDLTA ALEKA  
 AAO57279 RLISITANIG DTKTITHPS TTSHGRAPQ EREBAGIRDS LIRVAVGLEH VADLQADLAR GLAAL  
 AAN83435: RVSITINIG DTKTIAHPA TTSHGRSPPE DRAGIGDS LIRVAVGLEH LDELKADMAR GLAAL  
 NP\_284520. ELFSRTANIG DVRSITIHFW TTTHGRMOPE EKLAANIRPG LVRLSVGLEY VGDLDLDDLKQ ALAR  
 Consensus .L.s...anlg DaksL...HPa tTtH.rI.pe e..aag!... !RlsvGLE. .dDliadL.. ala....

Figure 6 (fin)



9/10

**Figure 7**

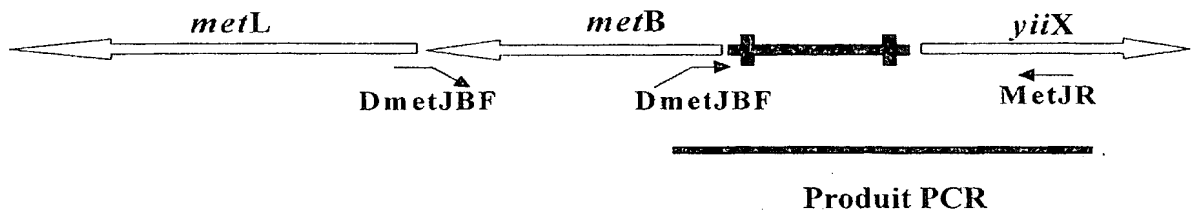


Figure 8

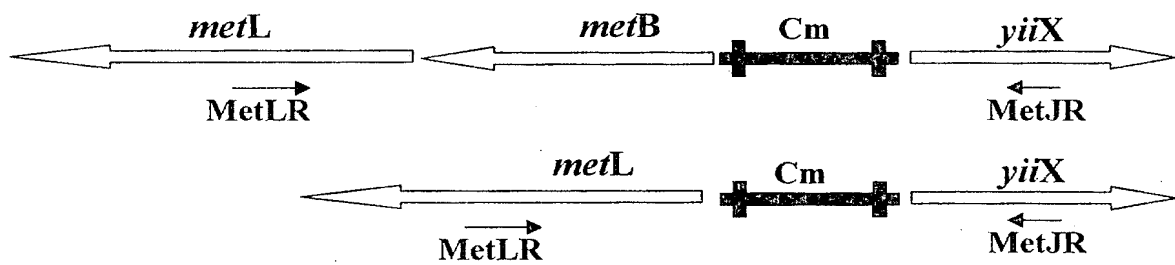


Figure 9

## LISTE DE SEQUENCE

<110> Metabolic Explorer

<120> Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

<130> D21189

<150> FR 03/01 924

<151> 2003-02-18

<160> 19

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTAC-O

<400> 1

gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aa

42

<210> 2

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pLAC-O

<400> 2

ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tataatgtgt ggaa

44

<210> 3

<211> 43

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTRC-O

<400> 3

gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataatgtgtg gaa

43

<210> 4

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTHLA

<400> 4

aatatattga taaaaataat aatagtgggt ataattaagt tggt

44

<210> 5

<211> 1161

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Séquence non mutée

<400> 5

atgacgcgta	aacaggccac	catcgcagtg	cgtagcgggt	taaatgacga	cgaacagtat	60
ggttgcggtg	tcccaccgat	ccatctttcc	agcacctata	actttaccgg	atttaatgaa	120
ccgcgcgcgc	atgattactc	gcgtcgcggc	aacccaacgc	gcgatgtggt	tcagcgtgcg	180
ctggcagaac	tggaaggtgg	tgctggtgca	gtacttacta	ataccggcat	gtccgcgatt	240
cacctggtaa	cgaccgtctt	tttgaaacct	ggcgatctgc	tggttgcgcc	gcacgactgc	300
tacggcggtg	gctatcgctt	gttcgacagt	ctggcgaaac	gcggttgcta	tcgcgtgttg	360
tttggtgatc	aaggcgatga	acaggcatta	cgggcagcgc	tggcagaaaa	acccaaactg	420
gtactggtag	aaagcccaag	taatccattg	ttacgcgtcg	tggtatattgc	gaaaaatctgc	480
catctggcaa	gggaagtcgg	ggcggtgagc	gtggtggata	acaccttctt	aagcccggca	540
ttacaaaatc	cgctggcatt	aggtgccgat	ctggtgttgc	attcatgcac	gaaatatctg	600
aacggtcact	cagacgtagt	ggccggcggtg	gtgattgcta	aagaccggga	cgttgtcact	660
gaactggcct	ggtgggcaaa	caatattggc	gtgacgggcg	gcgcgtttga	cagctatctg	720
ctgctacgtg	ggttgcgaa	gctggtgccg	cgtatggagc	tggcgcagcg	caacgcgcag	780
gcgattgtga	aatacctgca	aacccagccg	ttggtgaaaa	aactgtatca	cccgtcggtg	840
ccggaataatc	aggggcatga	aattgccgcg	cgccagcaaa	aaggctttgg	cgcaatgttg	900
agttttgaac	tggtatggcg	tgagcagacg	ctgcgtcggt	tccctggcgg	gctgtcggtg	960
tttacgctgg	cggaatcatt	agggggagtg	gaaagtttaa	tctctcacgc	cgcaaccatg	1020
acacatgcag	gcatggcacc	agaagcgcgt	gctgccgcgc	ggatctccga	gacgctgctg	1080
cgtatctcca	ccggtattga	agatggcgaa	gatttaattg	ccgacctgga	aaatggcttc	1140
cgggctgcaa	acaaggggta	a				1161

<210> 6

<211> 386

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Séquence non mutée

<400> 6

Met	Thr	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp
1			5						10					15	
Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	Cys	Val	Val	Pro	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Ser	Thr
	20							25				30			
Tyr	Asn	Phe	Thr	Gly	Phe	Asn	Glu	Pro	Arg	Ala	His	Asp	Tyr	Ser	Arg
	35						40					45			
Arg	Gly	Asn	Pro	Thr	Arg	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu
	50					55					60				
Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Met	Ser	Ala	Ile
65			70						75					80	
His	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
		85							90					95	

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala  
 100 105 110  
 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln  
 115 120 125  
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu  
 130 135 140  
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys  
 145 150 155 160  
 His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe  
 165 170 175  
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val  
 180 185 190  
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala  
 195 200 205  
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp  
 210 215 220  
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln  
 245 250 255  
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val  
 260 265 270  
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile  
 275 280 285  
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu  
 290 295 300  
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His  
 325 330 335  
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala  
 340 345 350  
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp  
 355 360 365  
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn  
 370 375 380  
 Lys Gly  
 385

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1161

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Séquence mutée - souche K183

&lt;400&gt; 7

```

atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat      60
ggttgcgttg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa      120
ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aaccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg      180
ctggcagaac tggaaggtgg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtcgcgatt      240
cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcatctgc tggttgcgcc gcacgactgc      300
tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgcgtgttg      360
tttgttgata aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg      420
gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc      480
catctggcaa gggaagtcgg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca      540
ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg      600
aacggtcact cagacgtagt ggccggcgctg gtgattgcta aagacccgga cgttgtcact      660
gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggcg gcgcgtttga cagctatctg      720
ctgctacgtg ggttgcgaaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag      780
gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg      840
ccggaaaaac aggggcatga aattgccgcg cgccagcaaa aaggctttgg cgcaatgttg      900
agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcggtt tcctgggagg gctgtcgttg      960
tttacgctgg cggcatcatt agggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg     1020
acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgcg ggatctccga gacgctgctg     1080
cgtatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc     1140
cgggctgcaa acaaggggta a                                     1161

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 386

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Séquence mutée - souche K183

&lt;400&gt; 8

```

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp
1          5          10          15

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
          20          25          30

Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
          35          40          45

Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
          50          55          60

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
65          70          75          80

His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
          85          90          95

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
          100          105          110

Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln

```

115	120	125
Ala Leu Arg Ala Ala Leu	Ala Glu Lys Pro Lys	Leu Val Leu Val Glu
130	135	140
Ser Pro Ser Asn Pro Leu	Leu Arg Val Val Asp	Ile Ala Lys Ile Cys
145	150	155 160
His Leu Ala Arg Glu Val	Gly Ala Val Ser Val	Val Asp Asn Thr Phe
	165	170 175
Leu Ser Pro Ala Leu Gln	Asn Pro Leu Ala Leu	Gly Ala Asp Leu Val
	180	185 190
Leu His Ser Cys Thr Lys	Tyr Leu Asn Gly His	Ser Asp Val Val Ala
	195	200 205
Gly Val Val Ile Ala Lys	Asp Pro Asp Val Val	Thr Glu Leu Ala Trp
	210	215 220
Trp Ala Asn Asn Ile Gly	Val Thr Gly Gly Ala	Phe Asp Ser Tyr Leu
	225	230 235 240
Leu Leu Arg Gly Leu Arg	Thr Leu Val Pro Arg	Met Glu Leu Ala Gln
	245	250 255
Arg Asn Ala Gln Ala Ile	Val Lys Tyr Leu Gln	Thr Gln Pro Leu Val
	260	265 270
Lys Lys Leu Tyr His Pro	Ser Leu Pro Glu Asn	Gln Gly His Glu Ile
	275	280 285
Ala Ala Arg Gln Gln Lys	Gly Phe Gly Ala Met	Leu Ser Phe Glu Leu
	290	295 300
Asp Gly Asp Glu Gln Thr	Leu Arg Arg Phe Leu	Gly Gly Leu Ser Leu
	305	310 315 320
Phe Thr Leu Ala Ala Ser	Leu Gly Gly Val Glu	Ser Leu Ile Ser His
	325	330 335
Ala Ala Thr Met Thr His	Ala Gly Met Ala Pro	Glu Ala Arg Ala Ala
	340	345 350
Ala Gly Ile Ser Glu Thr	Leu Leu Arg Ile Ser	Thr Gly Ile Glu Asp
	355	360 365
Gly Glu Asp Leu Ile Ala	Asp Leu Glu Asn Gly	Phe Arg Ala Ala Asn
	370	375 380
Lys Gly		
385		

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Oligonucléotide DmetER

<400> 9

tacccccgac gcaagttctg cgccgcctgc accatgttcg ccagtgcgc gcgggtttct 60  
ggccagccgc gcgttttcag catatgaata tctccttag 100

<210> 10

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetEF

<400> 10

tgacaatatt gaatcacacc ctcggtttcc ctgcggttg cctgcgctgc gagctgaaaa 60  
aagcgcaaga aagttattgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetER

<400> 11

ggtttaagca gtatggtggg aagaagtcgc 30

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetEF

<400> 12

cccggggatg aataaacttg ccgccttccc 30

<210> 13

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetCR

<400> 13

ccggcgcca gatcggaat cagatcgctg acatcttcca gaccaatatg caggcgaatc 60  
aaggtcccgc taaaatcgat catatgaata tctccttag 100

<210> 14

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide DmetCF

&lt;400&gt; 14

cggacaaaaa gcttgatact caactggtga atgcaggacg cagcaaaaaa tacactctcg 60  
 gcgcggtaaa tagcgtgatt tgtaggctgg agctgcttcg 100

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide MetCR

&lt;400&gt; 15

cgtccgggac gccttgatcc cggacgcaac 30

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide MetCF

&lt;400&gt; 16

gcgtttacgc agtaaaaaag tcaccagcac gc 32

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide DmetJBF

&lt;400&gt; 17

tatgcagctg acgacctttc gcccctgcct gcgcaatcac actcattttt accccttggt 60  
 tgcagcccg aagccatttt caggcaccag agtaaacatt 100

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide MetJR

&lt;400&gt; 18

ggtacagaaa ccagcaggct gaggatcagc 30

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetLR

<400> 19

aaataacact tcacatcagc cagactactg ccaccaaatt t

41

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .../.../...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 250899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		240589 D20701 FT	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0305768	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) MICROORGANISME A ACTIVITE METHIONINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA METHIONINE.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> METABOLIC EXPLORER : BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHATEAU Michel	
Prénoms			
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1	
	Code postal et ville	63200 RIOM	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GONZALEZ Benjamin	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, rue Sidoine Apollinaire	
	Code postal et ville	63000 CLERMONT-FERRAND	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul	
Prénoms			
Adresse	Rue	Chant du Coucou	
	Code postal et ville	31450 DEYME	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		15 octobre 03 Franck Tébey gk-1103 	

